

Dünnschichtchromatogramme - auch für den Amateur möglich

Einleitung

In der neueren Literatur findet der lichenologische Amateur immer wieder die Bemerkung, dass die Artbestimmung bei gewissen Flechtengattungen ohne den Einsatz von Dünnschichtchromatogrammen (DC) nicht möglich ist und dass man dazu ein gut ausgerüstetes Labor braucht. Das klingt recht entmutigend, und nur wenige unter uns dürften die Möglichkeit haben, sich in der eigenen Wohnung einen Abzug einbauen zu lassen und nur wenige haben zu Hause so viel Platz, um z.B. die Anleitungen von CULBERSON & AMMANN (1979) umsetzen zu können. Von chemotaxonomisch arbeitenden Diplomanden/Doktoranden ist später oft nichts mehr zur Flechtenchemie zu hören, sobald die Ausbildung beendet ist und das staatlich finanzierte Universitätslabor nicht mehr zur Verfügung steht.

Bei einem Besuch von Dr. V. John in Bad Dürkheim, lernte ich bei ihm die kleinen horizontalen Trennkammern für 5x5 cm große HPTLC-Plättchen der Firma DEGASA kennen. Wieder zu Hause besorgte ich mir die bei ihm gesehenen Geräte und begann herumzuprobieren. Es ergaben sich allerlei hübsche Fleckchen, doch die Zuordnung, um welche Inhaltsstoffe es sich handelte, war problematisch und völlig indiskutabel waren alle Anweisungen, wie man sich auf den kleinen Platten Notizen machen sollte. Das Umrahmen der Flecke unter UV-Licht war viel zu ungenau, der Platz zu gering und letztendlich wurden die kleinen DC-Plättchen nur hoffnungslos zerkratzt. Eine sinnvolle Auswertung war mir nicht möglich und ich legte die Angelegenheit als belustigende Spielerei wieder zur Seite.

Durch die Beschäftigung mit außereuropäischen Parmelien wurde die Sache für mich aber wieder akut und die Analyse der Inhaltsstoffe der Arten unumgänglich. Bei entsprechender fotografischer Dokumentation, nur diese läßt sich nachher bequem ausmessen, und eines einfachen Auswertungsschemas erwiesen sich die kleinen DC-Plättchen doch als sehr hilfreich und nützlicher als ich anfänglich angenommen hatte. Über diese Erfahrungen soll hier berichtet werden.



Geräte

Trennkammern

1x DESAGA DC-Schnelltest-Set bestehend aus: H-Trennkammer 5x5 cm, Auftragschablone, Mikrokapillaren, HPTLC-Fertigplatten, Praktikumsbuch, nutzlosen Testlösungen. (Best. Nr. DESAGA 120090, 318 EUR, zu bestellen über Sarstedt AG & Co., Postfach 1220, D-51582 Nümbrecht)



Abbildung 1: Zwei Schablonen mit aufgelegten DC-Platten, Mikrokapillarenhalter in Acetonglässchen zum Reinigen

Auf einer DC-Platte kann man 9 Probenextrakte aufbringen.

Zusätzlich ist es sinnvoll mindestens 2 weitere Trennkammern anzuschaffen, so dass man später die Flechtenextrakte synchron in den Laufmitteln A, B, C zerlegen kann. Dazu sind erforderlich:

2x H-Trennkammer 50x50 mm, je 93,00 EUR (Best. Nr. DESAGA 120150)



Abbildung 2: Trennkammern und Fläschchen, die die Laufmittel enthalten

2x Auftragsschablone 50x50 mm, je 25,50 EUR (Best. Nr. DESAGA 120135).

Im Prinzip könnte man auch mit einer Schablone auskommen, auf die man nacheinander die DC-Plättchen legt. Es spart aber viel Zeit, wenn man den Extrakt einer Flechte nacheinander auf drei auf eigener Schablone bereit liegende DC-Platten auftragen kann und wenn man nicht jedesmal ein DC-Plättchen im zyklischen Tausch durch ein anderes vorsichtig ersetzen muß. Die Gefahr, dass die SiO₂-Schicht an den Plattenrändern abbröckelt oder mit wachsender Ungeduld dort Fingerabdrücke entstehen, ist wesentlich geringer.

2x Deckscheibe 50x50 mm für H-Trennkammer, je 7 EUR (Best. Nr. DESAGA 120156)

1x Frittenstäbchen 50 mm, 5 Stück, 37,50 EUR (Best. Nr. DESAGA 120155)

Weiteres Verbrauchsmaterial, zum Nachbestellen:

Merck HPTLC-Platte K60 F254, 50*50 mm vorgeritzt, 100 Stück, 155 EUR (Best. Nr. DESAGA 121280)

Mikrokapillare, 0,5 µl, 100 Stück, ein Halter, 15 EUR (Best. Nr. DESAGA 120192)

UV-Lampe

z.B. Vetter GmbH, Postfach 4020, D-69161 Wiesloch

UVKL-6 U, kurz- u. langwellig 6 Watt, umschaltbar, ca. 300 EUR (Art.Nr.: 29113)

Kleine Reaktionsgefäße aus Kunststoff, z.B. PCR-Reaktionsgefäße, PP farblos dünnwandig, 0,2 ml, spitz zulaufend, einzeln anhängender gewölbter Deckel. Die Röhrchen sind gerade so kurz, dass man mit den Mikrokapillaren gut die Spitze erreicht. 1000 Stück, 45 EUR (Best. Nr. 781300, Brand GmbH, Postfach 1155, D-97861 Wertheim). Gefäße mit geradem Boden sind unzweckmäßig, weil man mehr Aceton braucht, um die Flechtenstückchen vollständig mit Aceton zu bedecken.

Zur Dokumentation

Web-Camera (z.B. ToUcam von Philipps, mit ULEAD Fotoexpress) oder Digitalcamera (z.B. NIKON COOLPIX oder CANON EOS D30 mit



ca 5mm Zwischenring für Nahaufnahme, mit Adobe Photoshop 5.0), PC oder Notebook, Farbdrucker (z.B. Epson Stylus Color 760 oder ähnlichen)

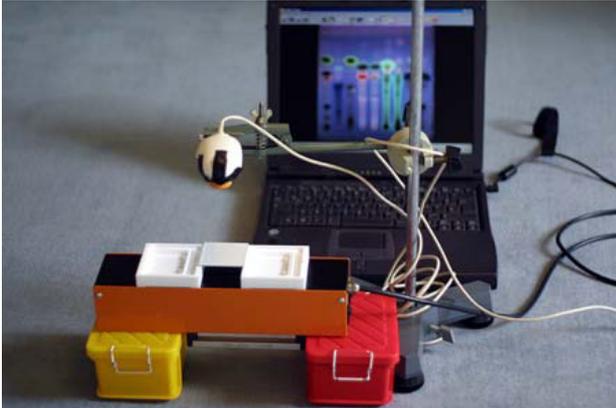


Abbildung 3: Apparatur zur Aufnahme der Chromatogramme (UV-Lampe, TLC-Platte, Web-Cam, Notebook)

Zersteuber (nicht unbedingt nötig aber praktisch)

Spezialzersteuber von DESAGA, 100 ml Erlenmeyerkolben mit Glasschliff, Zersteuberaufsatz und Gummiball, ca. 50 EUR (Best. Nr. DESAGA 124000)

Wärmeschrank (nicht unbedingt nötig aber praktisch)

Chemikalien

Aceton, Ameisensäure, Diethyläther, Dioxan, Essigsäure, Schwefelsäure, Toluol, u.s.w.

Extraktion der Flechtenproben

In einen Streifen Styropor (ca. 17 x 4 x 2 cm, Verpackungsmaterial!) bohrt man mit einem Bleistift 9 Löcher, nummeriert sie mit 1 bis 9 durch und steckt 9 der unten spitz zulaufenden PCR-Gefäße hinein. Diese billige Halterung reicht völlig aus.

In die Spitze jedes Röhrchen kommt 1-3 mm² der zu untersuchenden Flechte hinein.

Dann gibt man in jedes Röhrchen 1 höchstens 2 Tropfen Aceton. Diese Menge reicht völlig aus, um drei DC's anzufertigen.

Über die Extraktionszeiten schweigen sich die meisten Autoren (WHITE et al. 1985, ARUP et al. 1993, ORANGE et al. 2001) gründlich aus. Bei *Lepraria* genügen wenige Minuten bei Blattflechten habe ich meist ca 1-3 Stunden gewartet.

Leider sind die HPTLC-Plättchen am Rand nicht gleich dick beschichtet wie in der Mitte (gegen das Licht halten, durchsehen!), so dass die Rand-Bahnen 1 und 9 oft schlechte Werte liefern. Daher benutze ich in der Regel Bahn 3 für die „Eichsubstanz“, ein Gemisch aus *Cladonia symphycarpi* (Norstictin-, Connorstictinsäure) und *Platismatia glauca* (Atranorin).

Das etwas knifflige Auftragen der Extrakte auf die HPTLC-Platten mit Hilfe der Schablonen und den 0,5 µm Mikrokapillaren ist in dem kleinen, mitgelieferten Handbuch gut beschrieben. Es ist unnötig und nur eine Verschwendung, wenn man für jede Probe eine neue Kapillare benutzt. Man schüttet sich in ein kleines Sammelglässchen (z.B. 3 cm hoch, 2 cm Durchmesser) etwas Aceton, in das man die zu reinigende Kapillare ca. 3-4 taucht und auf Papier ausdrückt. Dann wendet man die Kapillare in der Halterung und wiederholt den Reinigungsvorgang. Dadurch ist sichergestellt, dass nicht am oberen Ende der Kapillare noch etwas vom alten Flechtenextrakt hängen geblieben ist. Nachdem ich in



der Eile mehrmals dieses Sammelglässchen umgeworfen habe, stelle ich es immer zur Vorsicht in eine größere Glasschale.

Nach dem Aufbringen der Extrakte markiere ich die Flecke mit Hilfe der Schablone mit einem weichen Blei, ziehe durch diese Punkte eine Startlinie, nummeriere sie und beschrifte die Platten. Jeder wird sein eigenes System entwickeln. Ich verwende folgendes Schema P130A, P130B, P130C etc. für die Analyse Nr. 130 in den Laufmitteln A, B, C und, da man schon so viele Nummern für Herbarproben, Bilder, etc vergibt, erhält die Nummer noch den Bezeichner P für die DC-Platten.

Bevor die Plättchen in die Trennkammern kommen, müssen sie gut getrocknet sein. ARUP et al. (1993) empfehlen, da die Platten Feuchtigkeit anziehen sollen, 5- minütiges Verweilen in einen Wärmeschrank bei 50 °C. Ich habe zwar den Eindruck, dass dies bei mir die Resultate nicht beeinflusst (Raumluftfeuchte ?), stecke aber zur Vorsicht meine Platten in den Wärmeschrank, während ich die restlichen Sachen vorbereite.

In die Trennkammern gebe ich wenige Tropfen Laufmittel, so dass die Frittenstäbchen gut durchfeuchtet sind und man an ihren Enden etwas Laufmittel in den Halterungsschlitzen stehen sieht. In die Hauptkammer gebe ich zusätzlich zur Dampfsättigung noch 1-3 Tropfen Laufmittel. Das Auflegen der Platten übt man beim ersten mal am Besten mit noch trockenen Frittenstäbchen. Während der ca. 10 Minuten, die der Entwicklungsprozess braucht, muß man ab und zu wenige Tropfen (keine Überschwemmung produzieren!) des Laufmittels nachgeben. Der Flüssigkeitsverbrauch ist so gering (weniger als 1 ml), dass ein Abzug völlig überflüssig ist. Ich entwickle die Platten immer bis zum „Anschlag“ über die ca 4,5 cm lange Laufstrecke.

Dann werden die Plättchen schnell abgehoben, die Kante mit der Startlinie wird, falls dort noch viel Laufmittel zu sehen ist, schnell auf ein Tempotaschentuch gesetzt, damit Flecke in der Nähe der Startlinie nicht nachträglich verschmieren, und zum vollständigen Trocknen beiseite gestellt. Wenn die Platten nicht mehr nach Essigsäure riechen, sind sie zur Beobachtung im UV-Licht bereit.

Dann folgt die Photographie der Platten in kurzwelligem und langwelligem UV-Licht. Damit die Intensität zur Photographie ausreicht, durchstrahle ich die Platten, Schichtseite zur UV-Lampe hin, von unten nach oben. Die Trennkammern kann man als Distanzhalter verwenden (Abb. 3). Als Dunkelkammer dient die Küche, deren Fenster ich durch passende Sperrholzplatten verdunkle.

Dann folgt das Besprühen mit 10% iger Schwefelsäure. Dazu lege ich die Platten im Garten oder Hausgang auf Zeitungspapier und verwende den einfachen Spezialzersteuber von DESAGA. Auch Tauchen oder Bepinseln mit Schwefelsäure wird von manchen Autoren empfohlen. Dadurch kommen als weiße Flecke Fettsäuren etc. zu Tage, die sofort auf schwarzer Unterlage wieder fotografiert werden. Ich verzichte auf das Bestäuben mit Wasser, weil durch diese Manipulation doch oftmals Flecke irgendwie in ihrer Position verschoben werden.

Dann kommen die Platten für ca. 30 Minuten bei 110 °C in den Wärmeschrank bis Norstictinsäure schön gelborange zum Vorschein gekommen ist. Notfalls tut es auch eine



Heizplatte mit Thermostat oder sogar ein Feuerzeug (KUROKAWA 1973, Seite 574: "Substances were detected as colored spots by heating over an alcohol flame after spraying with 10% sulphuric acid").

Dann folgt in gewohnter Weise die Photographie der Platten in langwelligem UV-Licht und Tageslicht.

Laufmittel

Die Zusammensetzung der Standardlaufmittel kann aus der Literatur entnommen werden. Leider ist sie nicht so standardisiert, wie man annehmen möchte und schon bei den Laufmitteln A, B und C weichen die Rezepturen leicht voneinander ab.

CULBERSON 1972

A: benzene – dioxane – acetic acid (180:45:5)
 B: hexane – diethyl ether – formic acid (130:80:20)
 C: toluene – acetic acid (200:30)

B: Cyclo-hexane – methyl tert.-butyl ether – formic acid (130:100:20)
 C: Toluene – acetic acid (200:30)

ARUP & al. 1993

A: Toluene – dioxane – acetic acid (112,5:37,5:5)

WHITE & JAMES 1985

A: Toluene – dioxan – acetic acid (180:60:8)
 B: Hexane – diethylether – formic acid (130:100:20)
 C: Toluene – acetic acid (200:30)

Sicher ist es nicht sinnvoll, ständig die Zusammensetzungen neu auszuprobieren, da man dann immer wieder neue Tabellen anlegen muss. Weitere Rezepturen findet man in der Literatur. Ich setze mir die Mischungen in Mengen von 50 ml an und bewahre sie in kleinen braunen Enghalsflaschen mit Schraubverschluß auf.

Bemerkungen zur Fotographischen Dokumentation und zum Ausdruck

Während die mit Säure behandelten DC-Platten auch mit jedem billigen Scanner eingescannt werden können, ist für die Dokumentation im UV-Licht eine Web-Camera oder eine Digitalcamera unerlässlich. Die Philipps ToUcam kann ohne Zusatzlinse so nah an die Platen gebracht werden, dass diese formatfüllend abgebildet werden. Für die Aufnahmen in langwelligem UV-Licht von noch nicht säurebehandelten Platten ist die Webcamera allerdings kaum noch verwendbar, da die Intensität des abgestrahlten Lichtes zu gering ist. Sonst funktioniert die elektronische Automatik dieser Webcamera erstaunlich gut und pendelt sich nach wenigen Sekunden auf die geringe Lichtintensität ein. Auf diese billige Weise ergeben sich durchaus brauchbare Bilder, die kaum noch elektronisch nachgebessert werden müssen. Besser, aber auch wesentlich teurer ist der Einsatz einer digitalen Kamera. Ich verwende dazu die Canon Eos 3 D, (Aperturvorgwahl Av: 5.6, 1 Stufe kürzer belichten, Selbstauslöser). Die Bilder der Canon sind zunächst enttäuschend kontrastarm, zeigen aber bei elektronischer Nachbearbeitung, dass alle gewünschte Information vorhanden ist. Entscheidend ist die Kontrast- und Helligkeitsbearbeitung.



Besonders bewährt hat sich bei mir das Programm Adobe Photoshop. Mit der Befehlsfolge „Bild→Einstellen→Tonwertkorrektur→Auto“ gewinnen die flauen Bilder schlagartig an Leuchtkraft und viele Flecke im UV-Licht werden sichtbar, die zuvor kaum zu entdecken sind. Sicher kann man auch andere digitale Kamerateypen (z.B. Nikon Coolpix) verwenden. Gleichgültig ob das Bild mit Kamera oder Webcam erzeugt wurde, folgt dann das passende Zuschneiden (crop-Funktion) und ggf. ein horizontales Spiegeln (bei der Durchstrahlung wurden die Platten von der Rückseite fotografiert!).

Die Bilder werden passend bezeichnet, z.B.:

P130a_L.jpg	Platte vor Säurebehandlung in langwelligem UV-Licht
P130a_K.jpg	Platte vor Säurebehandlung in kurzwelligem UV-Licht
P130a_Wasser.jpg	Platte nach Besprühen mit Säure vor Hitzetrocknung
P130a_LS.jpg	Platte nach Säurebehandlung in langwelligem UV-Licht
P130a.jpg	Platte nach Säurebehandlung in Tageslicht

Dann erfolgt der Ausdruck mit einem Tintenstrahl-Drucker etwa im Format 18 x 18 cm. Bei meinem Epson-Stylus 760 genügt zumeist normales Papier und mittlere Druckqualität.

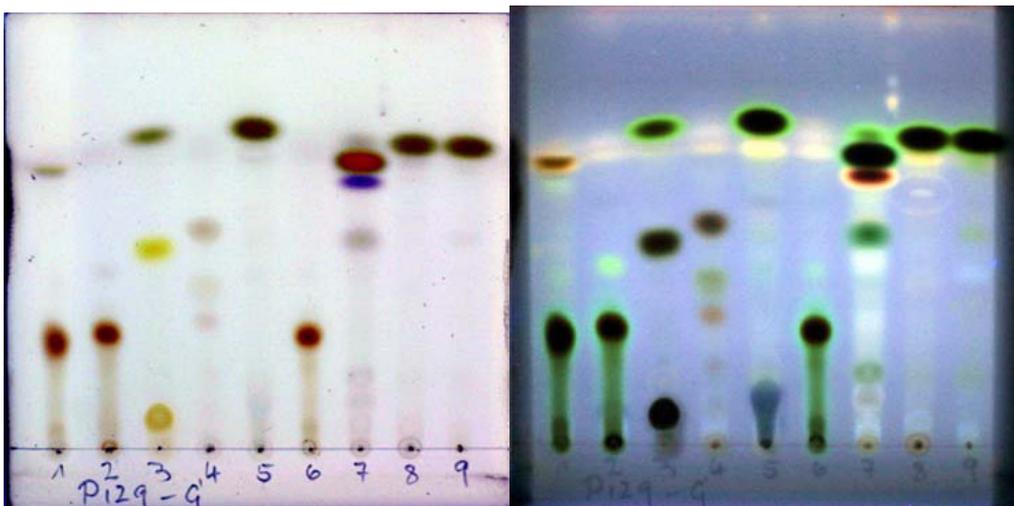


Abbildung 4: TLC-Palitte nach Trennung mit Laufmittel C im Tageslicht (links) und (rechts) nach Säurebehandlung und im langwelligigen UV-Licht

Vor der Auswertung muß man zumeist die Startlinie und die Bahnnummern nochmals nachzeichnen. Ergänzt wird das Konvolut der Buntdrucke (bei Laufmitteln A, B, C mindestens 15 Blätter) durch ein Blatt, auf dem die untersuchten Proben (Bahn, Herbarnr, Gattung, Art, Fundort, Notizen) notiert sind.

Die Originalplättchen können in kleinen Herbarkapseln eingeschlossen aufbewahrt werden. Sie ändern im Lauf der Zeit jedoch die im Vergleich zu den Ausdrucken blassen Farben und werden eigentlich nicht mehr gebraucht. Zur Auswertung, zum Eintragen von Notizen, zur Beschriftung, zur Beurteilung der Farben und zum Vergleich verwende ich ausschließlich meine Ausdrücke.



Erst durch diese vergrößerten Drucke ist ein vernünftiges Ausmessen der Chromatogramme möglich. Zudem kann man schnell auf frühere Analysen zurückgreifen und die Blätter am Boden nebeneinander zum Vergleich auslegen.

Auswertung der Ausdrucke

Es ist bekannt, dass die Rf-Werte ($100 \cdot [\text{Startlinie-Fleckposition}] / [\text{Startlinie-Laufmittelfront}]$) schlecht reproduzierbar sind. Zum Beispiel schwanken meine Werte für Atranorin im Laufmittel A von 79 bis 86 (Mittelwert 83). Aber auch bei CULBERSON (1972) findet man Abweichungen von 71 bis 87 (Mittelwert 76) und ebensolche Abweichungen zeigen die Tabellen von ARUP et al (1993). Natürlich könnte man für alle angefertigten Platten Mittelwerte berechnen, doch sind diese zur Interpretation einer einzelnen Platte absolut wertlos.

Es wurden daher verschiedene Verfahren zur Normierung vorgeschlagen (CULBERSON et al. 1979, ORANGE et al. 2001, WHITE et al. 1985). Die bei CULBERSON (1979) und WHITE et al. (1985) beschriebene Einteilung in Klassen, hat den Nachteil, dass die Grenzen der Zonen 1, 4 und 7 nicht klar definiert sind und Information verschenkt wird, zudem sind keine Mittelwerte bildbar und es gibt zu viele Substanzen mit gleicher Kombination von Klassen. Die Normierung wie sie – allerdings schlampig und ungenau – bei ORANGE et al. (2001) beschrieben ist, liefert für unsere kleinen Plättchen eine Scheingenaugigkeit. Die Anpassung der Werte mit Hilfe des „Cune“-Teils (entwickelt von Bruce McCune) im Programm Wintabulites (MIETSCH et al. 1992) verwendet eine andere Formel und eine andere Strategie, als die von mir nachfolgend besprochene Methode.

Meine Auswertungsmethode

Bekannt ist, dass das Teilverhältnis der Entfernungen dreier nah gelegener Flecke etwa konstant und unabhängig von der absoluten Position auf verschiedenen Platten ist. Mit anderen Worten: Ein Fleck, der in der Mitte zwischen zwei anderen, nicht zu weit entfernten Flecken liegt, bleibt auf allen Platten etwa in der Mitte auch wenn die absoluten Entfernungen von der Startlinie verschieden ausgefallen sind. Dies ist der Grund für den Erfolg der Klasseneinteilung nach CULBERSON.

Ich notiere die Lage der Flecke in folgender Weise:

Die Startlinie erhält den Positionswert 1. Wir zeichnen durch die Flecke von Norstictinsäure und Atranorin horizontale Geraden, welche die Positionen 4 und 7 definieren. Der Bereich zwischen 1 und 4 wird äquidistant mit zwei weiteren Geraden geteilt (Positionen 2 und 3) und dasselbe geschieht mit dem Bereich zwischen 4 und 7 (Positionen 5 und 6). Dadurch zerfällt das Chromatogramm in zwei jeweils unabhängig voneinander linear geteilte Bereiche (1-4 und 4-7). Die Lage der Flecke gebe mit 1 Dezimale genau in diesem Liniensystem an (5,5 liegt also genau in der Mitte zwischen den Positionen 5 und 6).

Im Gegensatz zur Klasseneinteilung, welche nur die Lage in einem Streifen festhält, sind diese Werte also genaue Positionen!

Ich habe diese Werte nicht aus Eitelkeitsgründen, sondern um sie in meinen Tabellen von anderen Zahlen sofort unterscheiden zu können „RS“ (Retention Schumm) getauft.





Die Einteilung ist so vorgenommen (Start mit 1 stat mit 0!), dass sie sich an die Klasseneinteilung von Culberson anlehnt. Es besteht etwa folgender Zusammenhang:

„Culberson Klasse 1“: $1,0 \leq RS < 1,3$

„Culberson Klasse 2“: $1,3 \leq RS < 2,5$

„Culberson Klasse 3“: $2,5 \leq RS < 3,7$

„Culberson Klasse 4“: $3,7 \leq RS < 4,2$

„Culberson Klasse 5“: $4,2 \leq RS < 5,5$

„Culberson Klasse 6“: $5,5 \leq RS < 6,8$

„Culberson Klasse 7“: $6,8 \leq RS < 7,3$

Startlinie $RS = 1$

Norstinsäure $RS = 4$ (per definition)

Atranorin $RS = 7$ (per definition)

Mit etwas Übung kann man die RS-Werte auf den mit Hilfslinien versehenen Ausdrucken auf eine Dezimale abschätzen oder mit dem Lineal ausmessen. Bei umfangreichen Auswertungen ist Excel nützlich, mit dem sich die Umrechnungen nach folgenden Formeln automatisieren lassen:

No = Entfernung Norstictinsäure - Startlinie (in cm, mm oder Rf-Werten, Maßeinheit kürzt sich bei der Berechnung heraus)

At = Entfernung Atranorin - Startlinie

X = Entfernung unbekannter Fleck - Startlinie

wenn $X \leq No$ dann die Formel:

$$RS = 1 + 3 \cdot X / No$$

wenn $X > No$ dann die Formel

$$RS = 4 + 3 \cdot (X - No) / (At - No)$$

Beispiel:

Für Physodalsäure erhielten wir im Laufmittel A das Wertetripel ($X = 25,6 / No = 59,7 / At = 83$). Weil $X < No$, berechnen wir:

$$RS = 1 + 3 \cdot 25,6 / 59,7 = 2,3$$

Die so erhaltenen Werte schwanken bei mir etwa im Bereich von $\pm 0,1 \dots 0,3$. Die Qualität mag durch einige Werte für Salazinsäure belegt werden.





RS in A	Platte Nr.	Abweichung vom Mittelwert
2,2	p056	0,0
2,2	p056	0,0
2,3	p056	0,1
2,2	p056	0,0
2,2	p059	0,0
2,2	p059	0,0
2,3	p044	0,1
2,2	p044	0,0
2,3	p044	0,1
2,3	p047	0,1
2,2	p050	0,0
2,2	p050	0,0
2,3	p050	0,1
2,3	p067	0,1
2,3	p067	0,1
2,2	p067	0,0
2,1	p068	0,1
2,2	p071	0,0
2,2	p071	0,0
2,1	p072	0,1
2,1	p072	0,1
2,2	p067	0,0
2,2	p068	0,0



	Laufmittel A	Laufmittel B	Laufmittel C
Mittelwert	2,2	1,6	1,6
mittlere Abweichung	0,1	0,1	0,1
mittlere Abweichung in %	2,4	4,3	4,3

Im Gegensatz zur einfachen Klasseneinteilung, bei der die Lage innerhalb von recht unterschiedlich breiten Streifen angegeben wird, handelt es sich bei den RS-Werten um eine genaue Positionsangaben, für die sinnvolle, \pm konvergente Mittelwerte über viele Platten berechnet werden können. Die Teilungsgeraden sind schnell in die Ausdrucke eingezeichnet und die Positionswerte sind bei Zeitmangel mit etwas Übung direkt abschätzbar. Ich glaube damit für mich einen Kompromiss zwischen vertretbarem Aufwand und der bei den kleinen Platten unter Heimbedingung überhaupt erreichbaren Genauigkeit gefunden zu haben.

Zur Identifikation der festgestellten Flecke mögen angehängten Tabellen hilfreich sein. Die Farben der Flecke und weitere wichtige Angaben entnehme man den im Literaturverzeichnis gelisteten Arbeiten.

Literatur

ARUP, U. & EKMAN, S. & LINDBLOM, K. & MATTSON, J.E. (1993) High performance thin layer chromatography (HPTLC), an improved technique for screening lichen substances. - *Lichenologist* **25**(1): 61-71.

CULBERSON, C.F. 1972. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by standardized thin-layer chromatographic method. – *J. Chromatogr.* **72**: 113-125.

CULBERSON, CH. F., AMMANN, K. 1979. Standardmethode zur Dünnschichtchromatographie von Flechtensubstanzen. - *Herzogia* **5**: 1-24

KUROKAWA, S. 1973. Supplementary notes on Anaptychia. - *J. Hattori* **37**: 563-607

MIETZSCH, E. & LUMBSCH, H. T. & ELIX, J. A. 1992. Wintabulites.- Users Manual. Universität Essen, Fachbereich 9 / Botanik

ORANGE, A., JAMES, P.W., WHITE, F.J.. 2001. Microchemical Methods for the identification of lichens. -*British Lichen Society*

WHITE, F. J. & JAMES, P.W. 1985. A new guide to microchemical techniques for the identification of lichen substances. - *Bull. Brit. Lich. Soc.* **57** (Supl.): 1-41.

Tafelanhang

Ich habe für eigene Zwecke die Tafeln von CULBERSON (1972) und ARUP et al. (1993) auf meine Werte umgerechnet. Da diese Autoren teils andere Platten (TLC statt HPTLC) oder andere Laufmittelrezepturen benutzen, sind deren Werte nicht bedenkenlos übertragbar.



Die Zahlen geben aber brauchbare Anhaltswerte und nicht selten lagen eigene Messungen dazwischen.

Tabelle 1: RS-Werte berechnet aus CULBERSON 1972

TLC-Platten, Merck Silica Gel F254, Dicke 0,25 mm

A: Benzin - Dioxan - Essigsäure (180:45:5)

B: Hexan - Diethyläther - Ameisensäure (130:80:20)

C: Toluol - Essigsäure (200:30)

	A	B	C
2'-O-methylperlatolic acid	5,2	5,5	5,5
2-O-methylanziaic acid	4,4	4,8	4,3
2-O-methylperlatolic acid	4,4	6,0	5,4
4-O-demethylbarbatic acid	3,9	5,8	4,6
4-O-demethylplanaic acid	4,1	4,1	4,0
4-O-methylcryptochlorophaeic acid	5,7	6,1	6,2
4-O-methylgyrophoric acid	3,4	5,8	5,0
4'-O-methylphysodic acid	3,7	4,9	4,8
acetylportentol	6,0	3,6	4,9
α -collatolic acid	3,9	4,3	4,4
alectorialic acid	3,7	5,2	4,1
alectronic acid	3,3	4,1	2,6
anziaic acid	3,9	6,0	4,3
arthoniaic acid	3,5	2,6	2,3
baeomycesic acid	3,8	4,5	4,8
barbatic acid	4,2	6,6	5,4
barbatolic acid	1,5	5,0	2,8
calycin	7,2	7,1	7,5
caperatic acid	1,3	3,8	1,5
chloroatranorin	6,9	7,0	7,0
colensoinic acid	3,9	6,6	4,8
confluentic acid	5,1	4,3	5,1
connorstictic acid	1,8	2,1	1,2
conpsoromic acid	2,1	4,4	2,3

consalazinic acid	1,2	1,1	1,0
constictic acid	1,5	1,3	1,3
cryptochlorophaeic acid	4,3	4,8	4,5
decarboxythamnolic acid	1,4	3,3	2,9
didymic acid	4,2	6,8	5,4
diffractaic acid	4,2	6,0	5,4
diploicin	6,0	6,9	6,3
diploschistesic acid	2,5	4,4	2,4
divaricatic acid	4,0	6,6	5,4
echinocarpic acid	1,8	4,1	2,1
emodin	5,4	5,8	4,7
endocrocin	1,6	4,1	1,8
entothein	4,4	2,7	3,6
epanorin	6,8	5,3	6,3
ergosterol	5,3	6,2	5,3
erythrin	1,4	1,5	1,1
ethyl orsellinate	6,1	6,2	4,9
Evans H	5,2	6,0	5,1
evernic acid	3,8	5,9	4,9
fragilin	6,7	7,2	6,7
fumarprotocetraric acid	1,1	3,7	1,7
galbinic acid	3,1	2,2	2,7
gangaleoidin	6,1	4,9	5,5
glomelliferic acid	4,0	4,9	5,0
grayanic acid	3,9	6,0	4,9



gyrophoric acid	2,8	4,8	3,6
haemathamnic acid	2,1	4,4	3,9
haemoventosin	3,4	1,2	2,9
homosekikaic acid	4,5	6,3	5,7
hypoprotocetraric acid	2,9	4,9	3,4
hypothamnolic acid	1,3	3,5	2,9
imbricarinic acid	4,1	6,9	5,2
lecanoric acid	3,1	4,9	3,4
leprapinic acid	6,9	5,9	7,1
leprarinic acid	3,0	2,1	3,3
lichesterinic acid	4,3	6,1	4,9
lichexanthone	7,0	6,7	7,0
lividic acid	3,4	4,4	4,2
lobaric acid	3,3	5,1	4,5
loxodin	5,5	4,8	4,4
menegazzaic acid	2,4	2,4	2,2
merochlorophaeic acid	5,3	5,8	5,9
methyl 3,5 dichlorolecanorate	6,3	6,1	6,2
methylgyrophorate	5,7	5,0	4,8
microphyllinic acid	4,3	4,4	4,8
miriquidic acid	3,9	5,3	5,0
nephroarctin	6,6	5,5	6,3
norlobaridone	4,8	4,5	3,2
norobtusatic acid	3,0	5,4	4,1
obtusatic acid	3,6	6,2	5,2
olivetoric acid	3,6	4,6	3,4
paludosic acid	3,9	4,5	4,2
pannaric acid	1,6	3,8	2,0
pannarin	7,0	6,6	7,0
parietin	7,1	6,8	7,1
perlatolic acid	4,1	7,1	5,5
physodalic acid	1,7	4,2	3,0
physodic acid	2,8	4,5	2,9

picrolichenic acid	3,7	4,7	4,4
pinastric acid	6,9	5,8	7,0
placodiolic acid	6,2	6,2	6,3
planaic acid	4,9	4,6	5,3
polyporic acid	4,2	4,1	3,8
porphyrillic acid	1,7	2,1	1,6
protocetraric acid	1,2	2,9	1,4
protolichesterinic acid	3,6	5,1	4,5
pseudoplacodiolic acid	5,7	5,2	5,7
psoromic acid	3,6	4,9	4,8
pulvinic acid	1,3	4,6	1,7
pulvinic dilactone	7,3	7,4	7,8
rangiformic acid	3,1	4,6	4,3
rhizocarpic acid	6,7	4,8	6,3
rhodophyscin (=skyrin)	4,2	4,3	3,4
roccellic acid	4,1	5,9	5,2
salazinic acid	1,8	1,7	1,4
schizopeltic acid	4,4	3,7	5,2
scrobiculin	6,3	5,7	5,4
sekikaic acid	4,3	5,8	5,4
siphulin	2,0	4,0	1,4
sphaerophorin	4,5	6,9	5,6
squamatic acid	1,7	3,5	3,6
stenosporic acid	4,3	6,8	5,5
stictic acid	3,3	2,0	2,9
strepsilin	3,9	3,3	3,6
sublimbatic acid	1,3	3,0	2,0
tenuiorin	7,0	5,9	6,8
thamnolic acid	1,2	3,3	2,4
thiophanic acid	5,3	5,6	5,4
thiophaninic acid	6,3	6,3	6,3
ursolic acid	5,5	5,4	5,4
usnic acid	6,5	6,6	6,5



variolaric acid	2,3	2,3	1,9
vicanicin	6,8	6,9	6,4
virensic acid,	2,9	5,7	4,6

vulpinic acid	6,9	6,3	7,2
zeorin	5,2	4,8	4,9

Tabelle 2: RS-Werte berechnet aus ARUP & al. (1993)

HPTLC - Platten, Merck Kieselgel 60 F254, Dicke 0,20 mm, Porengröße 6 nm

A: Toluol - Dioxan - Essigsäure (112,5:37,5:5)

B: Cyclohexan – Methyl tert.-butylether – Ameisensäure (130:100:20)

C: Toluol – Essigsäure (200:30)

	A	B	C
1-O-methylfragilin	3,9	3,8	2,8
2,7-dichlorolichexanthone	6,8	5,3	7,7
2'-O-demethylpsoromic acid	2,9	5,3	2,4
4-O-demethylbarbatic acid	3,8	5,7	4,7
α -collatolic acid	4,0	4,8	5,2
alectorialic acid	3,9	5,5	4,0
alectoronic acid	3,5	4,0	2,6
barbatic acid	4,4	7,0	6,1
barbatolic acid	3,4	3,3	2,4
caperatic acid	1,7	3,0	1,7
chloroemodin	5,2	5,7	5,9
confluentic acid	4,6	5,0	6,1
constictic acid	1,5	1,3	1,5
cryptochlorophaeic acid	4,0	5,7	4,9
cryptostictic acid	2,6	2,8	1,9
divaricatic acid	4,4	7,0	6,1
emodin	5,2	5,0	5,1
evernic acid	4,0	5,7	5,9
fumarprotocetraric acid	1,4	3,7	1,7
glomellic acid	3,9	3,9	4,7
glomelliferic acid	4,3	5,5	5,8
grayanic acid	4,0	6,6	5,9
gyrophoric acid	3,3	4,4	3,3
haemaventosin	3,7	1,4	2,4

homosekikaic acid	4,4	7,0	6,4
hyposalazinic acid	3,3	3,5	4,0
hypoconstictic acid	2,3	2,0	1,5
hypostictic acid	4,3	3,9	4,2
lecanoric acid	3,3	4,9	3,3
lichesterinic acid	4,4	6,6	5,9
lobaric acid	3,7	5,5	5,4
menegazzaic acid	2,7	2,8	1,9
merochlorophaeic acid	4,9	6,1	6,6
methyl gyrophorate	4,8	5,1	5,4
methylpannaric acid	2,8	4,3	2,6
olivetoric acid	3,7	5,3	3,5
oxyphysodic acid	2,8	4,4	2,2
pannaric acid	1,8	3,7	1,7
pannarin	6,8	6,3	7,0
parietin	7,0	6,7	7,2
perlatolic acid	4,4	7,4	6,4
physodalic acid	2,4	4,0	3,3
physodic acid	3,3	5,3	3,3
pinastric acid	6,6	6,0	7,0
porphyrillic acid	2,0	2,4	1,5
protocetraric acid	1,1	3,0	1,5
protolichesterinic acid	4,0	5,1	5,4
psoromic acid	4,0	5,7	5,5
rangiformic acid	3,7	4,7	5,0



rhizocarpic acid	6,8	5,3	6,6
roccellic acid	4,2	6,0	6,1
salazinic acid	2,0	2,1	1,2
schizopeltic acid	4,0	2,8	5,9
scrobiculin	6,1	6,0	6,4
sekikaic acid	4,0	6,6	6,1
silphulin	2,6	4,0	1,2
skyrin (=Rhodophyscin)	4,0	4,0	3,1
sphaerophorin	4,4	7,4	6,1

squamatic acid	2,3	3,2	3,8
stenosporic acid	4,8	5,1	6,5
stictic acid	3,2	2,1	2,6
tenuiorin	6,8	6,0	6,8
thamnolic acid	1,7	3,0	2,8
usnic acid	6,6	6,6	6,6
variolaric acid	2,7	2,5	1,7
vulpinic acid	6,6	5,7	7,6
zeorin	5,1	5,0	5,5

Tabelle 3: Eigene Ergebnisse

HPTLC Platten, Merck Kieselgel 60 F254, Größe 5x5 cm

Laufmittel nach WHITE ET JAMES (1985):

A: Toluol - Dioxan - Essigsäure (180 : 60 : 8)

B: Hexan – Diethylether – Ameisensäure (130 : 100 : 20)

C: Toluol – Essigsäure (200 : 30)

	A	B	C
α -collatolic acid	4,0	4,4	5,2
alectoronic acid	3,5	3,6	3,2
atranorin	7,0	7,0	7,0
barbatic acid	4,1	6,2	6,0
caperatic acid	1,8	3,3	1,9
connorstictic acid	2,0	1,8	1,3
consalazinic acid	1,2	1,0	1,0
constictic acid	1,6	1,0	1,2
cryptostictic acid	2,5	1,8	1,7
diffractaic acid	4,1	5,7	6,1
divaricatic acid	4,2	6,2	6,0
evernic acid	3,9	5,8	5,7
fumarprotocetraric acid	1,5	3,3	2,2
glomellic acid	3,7	3,5	4,5
glomelliferic acid	4,2	5,3	5,8
gyrophoric acid	3,3	4,8	3,5
lecanoric acid	3,4	5,0	3,5

linitin A	5,0	5,4	5,6
lobaric acid	3,7	5,3	5,3
menegazzaic acid	2,6	2,2	2,1
methylgyrophorate	4,9	5,3	5,5
norstictic acid	4,0	4,0	4,0
olivetoric acid	3,6	4,8	3,6
oxyphysodic acid	2,8	4,0	2,6
perlatolic acid	4,5	6,4	6,3
physodalic acid	2,3	4,1	3,3
physodic acid	3,3	4,7	3,5
protocetraric acid	1,5	2,6	1,7
protolichsterinic acid	4,2	5,7	5,5
rangiformic acid	4,0	5,3	5,2
roccellic acid	4,3	5,5	5,9
salazinic acid	2,2	1,6	1,6
scrobiculin	6,0	5,8	6,1
secalonic A acid	3,9	2,2	3,6
squamatic acid	2,4	3,4	3,7



stictic acid	3,2	1,7	2,5
thamnolic acid	1,8	2,8	2,7
tenuiorin	6,8	6,0	6,8

usnic acid	6,5	6,5	6,6
zeorin	5,0	5,1	5,7

Felix Schumm

Bericht zur Hauptexkursion 2002 der BLAM

Die diesjährige große Exkursion der BLAM fand in Norditalien in den Regionen Veneto und Südtirol statt. Zunächst führte der Weg nach Belluno, einer Provinzhauptstadt in Venetien, die ich nach einer längeren Fahrt über diverse Alpenpässe am frühen Abend erreichte. Dort richtete ich mich inmitten der Rushhour nach den Hinweisschildern in Richtung Nevegal. In Anbetracht der italienischen Verkehrsverhältnisse hatte ich wohl eine Abzweigung übersehen - jedenfalls beschlich mich das dumpfe Gefühl, im Kreis gefahren zu sein. Als ich zum zweiten Mal am selben Schild mit der Aufschrift „Nevegal“ vorbeikam, schoss mir der Gedanke durch den Kopf, dass dieses Wort möglicherweise „Durchgangsverkehr“ oder ähnliches, aber keinen bestimmten Ortshinweis bedeutet. Dennoch befolgte ich treu und brav der Richtungsweisung und erreichte tatsächlich die Randbereiche von Belluno. Etwas verwundert fuhr ich eine in Serpentina ansteigende Straße entlang, deren Ränder mit Strohballen bepolstert waren - offensichtlich fand hier ein Seifenkistenrennen statt. Nach einem kurzen Telefonat mit meinem Kollegen, Freund und Zimmergenossen während der folgenden Tage fuhr ich beruhigt weiter - der Weg stimmte! Schließlich erreichte ich das Hotel Olivia und bei einem sehr guten Abendessen sowie den netten Begrüßungen durch eine Vielzahl von Kollegen war die anstrengende Anreise rasch vergessen. Insbesondere freute ich mich, an diesem Abend mit Herrn Otto Lange und seiner Gemahlin zusammenzutreffen.

Am nächsten Morgen ging es dann mit der Sesselbahn auf den Bergzug des Nevegal. Leise schwebten wir über Baumwipfel und querende Skipisten der Gipfelstation knapp über der Baumgrenze entgegen und rätselten dabei über wunderschön blaue Blüten, die wir am Boden erspähen konnten. Oben angelangt liefen wir ein kurzes Stück zu einem dort angelegten alpinen botanischen Garten. Neben der natürlich vorhandenen Vegetation sind dort eine Reihe von Pflanzen des alpinen Lebensraumes zu sehen. Bemerkenswert ist, dass auch eine Reihe von Flechtenarten mit Namensangaben versehen sind – das war das erste Mal, dass ich einen „Flechtengarten“ gesehen habe. Unter anderem gab es dort oben *Bagliettoa parmigera*, *Caloplaca erodens*, *Rhizocarpon umbilicatum* etc. zu sehen. Nach einer kurzen Mittagspause unternahmen wir eine Wanderung zurück in Richtung Hotel, die uns durch die verschiedenen Höhenstufen des alpinen Waldes führte. Hier enträtselten wir das Geheimnis der morgens gesehenen blauen Blüten: zahlreich wuchs der Schwalbenwurz-Enzian (*Gentiana asclepiadea*) am Wegrand und natürlich fanden wir eine ganze Reihe von Flechtenarten. Obwohl recht reichhaltig, wies die Flechtenvegetation doch Zeichen einer Verarmung auf, welche durch die Nähe zu Belluno

